Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 383-397

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۹۷-۳۸۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Investigation of the Impact of Gallic Acid, Methyl Gallate and their Combination on the Oxidative Stability of Frying Oli

M. Hosseinkhani Abadchi[1], R. Farhoosh[2]*

Received: 2022.02.04
Revised: 2022.04.17
Accepted: 2022.04.26
Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:
Hosseinkhani Abadchi, M., & Farhoosh, R. (2023). Investigation of the Impact of Gallic Acid, Methyl Gallate and their Combination on the Oxidative Stability of Frying Oli. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(2), 383-397. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.75114.1144

Introduction

Thermal process is the most prominent option for treating foods. During the heat treatment, food nutrients response simultaneously but adversely under pH, temperature, moisture, and other provided conditions. It might result in an irreversible transformation of composition and structure that influences oxidative stability and sensory properties. The use of antioxidants is one of the most common methods to prevent edible oils oxidation. Safety concerns of synthetic antioxidants including tert-butylhydroquinone (TBHQ) as food additives have led to increasing demands for natural ones. Phenolic compounds such as Gallic Acid (GA) and Methyl Gallate (MG) represent to possess markedly high activity to scavenge free radicals which are among the most powerful natural sources of oxidative inhibitors in foods. Apart from their antioxidant activity, GA and MG also exhibit multiple biological characteristics such as anti-atherogenic, anti-spasmodic, and anti-microbial activities. This study aimed to investigate the oxidative stability of the in-use sunflower (S) and palm (P) oils as affected by the GA, MG, (GA+MG), and TBHQ to clarify their antioxidant behavior.

Materials and Methods

Antioxidants Gallic acid, Methyl gallate and TBHQ (Purity>98%) were purchased from Sigma Aldrich, USA. All solvents and chemicals were provided from Merck, Germany and Sigma Aldrich, USA with analytical grade. Antioxidant-free sunflower and palm oil were prepared from Three Goals factory, Neyshabur, and potatoes (Agria variety) from Fariman region, Khorasan Razavi.

Results and Discussion

Chemical changes, oxidative stability and quality indices of the in-use sunflower oil (*S*) and palm (*P*) (65:35 w.t. %) were evaluated during 8-hour heat treatment at 180 °C through GA, MG, GA/MG (25:75, 50:50 and 25:75) and TBHQ. All experiments were carried out in quadruplicate, and data were subjected to analysis of variance (One-way-ANOVA). Mean data were compared based on Duncan's multiple range test at 5% level ($p<0.05$). Observations of the chemical properties showed that sample *S* mainly contained Linoleic fatty acid (61.53%) and Oleic acid (25.50%) and for sample *P*, Oleic acid (41.90%) and the saturated long-chain fatty acid of Palmitic acid (38.9%). Also, the total phenolic content (TPC) and tocopherol (TTC) of sample *P* were 53.12 and 185($\mu g.g^{-1}$), respectively, and sample *S* were 36.01 and 490 ($\mu g.g^{-1}$). The results of oxidation stability test were analyzed based on Carbonyl value (CV), Conjugated diene value (CDV) and acidity (FFA) parameters. According to our findings, all parameters increased significantly at different

1 and 2 -M.Sc Graduated Student and Professor, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: rfarhoosh@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.75114.1144

speeds during the heat treatment ($p<0.05$). Moreover, the oxidative stability of the in-use oil was significantly promoted by the antioxidants added, meaning that the control treatment and the treatment containing synthetic antioxidant TBHQ had the highest and lowest FFA%, respectively. The CDV of the antioxidant-free treatment was reduced by 68.6% in the presence of GA75+MG25.In addition, the CV change rate of the antioxidant-free sample in the presence of TBHQ was reduced by 70.2%. It was concluded that the natural antioxidants were capable of being competed with TBHQ antioxidants.

Conclusion

The results of this study showed that the heat treatment affected the nutritional value, quality indexes and chemical structure of the treatments, decreasing the quality and stability of the oil. As observed, all FFA, CDV and CV parameters increased significantly at different speeds during 8-hour frying process. The analysis also indicated that the oxidative stability of the treatments increased at the presence of antioxidants during the heat treatment at 180 °C. Thus, the control treatment and the treatment containing synthetic antioxidant TBHQ had the highest and lowest acidity, respectively. Also, the CDV of the antioxidant-free treatment decreased by 68.6% in the presence of GA75+ MG25. In addition, the rate of CV changes was declined by 70.2% through the TBHQ. The results indicated the key role of this synthetic antioxidant in preventing the formation of secondary compounds in the advanced stages of oxidation.

It is evident that most synthetic antioxidants are volatile and heat sensitive. Furthermore, there are some limitations in applying TBHQ to promote oxidative stability of food products due to its toxic potential. Evidences have also been reported on the mutation caused by the synthetic antioxidant TBHQ in the living organism's body. Compared to synthetic antioxidants, natural polyphenolic antioxidants such as MG and GA which widely distribute in plants mainly have antioxidative properties. Compared to GA and MG, GA+MG antioxidants have a longer induction period and higher oxidative stability. Promoting oxidative stability with such an arrangement of antioxidants is a good option in taking advantage of this class of natural antioxidants. According to the results of this study, it can be inferred that with a slight increase in natural antioxidants levels, we might be able to obtain the oxidative stability level comparable to the behavior of synthetic antioxidant TBHQ. Of course, it is worth noting that the addition of natural antioxidants to food such as edible oils should also be done according to national and international standards.

Keywords: Carbonyl value, Conjugated diene value, Gallic acid, Fatty acids, Methyl gallate, Oxidative stability, TBHQ

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 383-397

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۹۷-۳۸۳

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر اسید گالیک، متیل گالات و ترکیب آنها بر پایداری اکسایشی روغن طی فرآیند سرخ کردن

مائده حسینخانی آبادچی[۱]- رضا فرهوش[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

چکیده

تغییرات شیمیایی، پایداری اکسایشی و شاخص‌های کیفی نمونه ترکیبی روغن آفتابگردان (SO) و نخل (PO) (PO ۳۵: SO ۶۵ وزنی/وزنی) در دمای ۱۸۰°C طی تیمار حرارتی ۸ ساعته در حضور آنتی‌اکسیدان‌های اسید گالیک (GA)، متیل گالات (MG)، ترکیب GA+MG (۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰ و ۲۵:۷۵) و ترسیوبوتیل هیدروکینون (TBHQ) مورد بررسی قرار گرفت. میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد (p<۰/۰۵) مقایسه شدند. بررسی خواص شیمیایی نشان داد ساختار اسیدهای چرب SO عمدتا حاوی اسید چرب لینولئیک (۶۱/۵۳ درصد) و اولئیک (۲۵/۵۰ درصد) و برای PO اولئیک (۴۱/۹۰) و پالمیتیک (۳۸/۹) می‌باشد؛ همچنین، محتوی کل ترکیبات فنولی (TPC) و توکوفرولی (TTC) نمونه PO به ترتیب ۵۳/۱۲ و ۱۸۵ و نمونه SO برابر با ۳۶/۰۱ و ۴۹۰ ($\mu g.g^{-1}$) بدست آمد. نتایج آزمون پایداری اکسایشی مبنی بر پارامترهای عدد کربونیل (CV)، عدد دی‌ان مزدوج (CDV) و اسیدیته (FFA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. طبق یافته‌ها، تمامی پارامترهای CV، CDV و FFA طی فرآیند سرخ کردن با گذشت زمان با سرعت‌های متفاوت به طور معناداری افزایش یافتند (p<۰/۰۵). همچنین، رابطه معناداری بین ۷ تیمار مشاهده شد؛ بدین‌صورت که تیمار شاهد و تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اسیدیته بودند. همچنین، محتوی CDV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان در حضور GA75+MG25 به اندازه ۶۸/۶ درصد کاهش یافت. علاوه‌براین، سرعت تغییر CV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان در حضور TBHQ به اندازه ۷۰/۲ درصد کاهش یافت. در نتیجه، افزودن جزئی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌تواند عملکردی رقابتی با آنتی‌اکسیدان TBHQ داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسید گالیک، اسیدهای چرب، پایداری اکسایشی، عدد دی‌ان مزدوج، عدد کربونیل، متیل گالات، TBHQ

مقدمه

سرخ کردن یکی از ساده‌ترین و سریع‌ترین روش‌های پخت غذا می‌باشد که موجب تولید فرآورده‌هایی با ویژگی‌های حسی (رنگ، بافت و آروما[۳]) و تغذیه‌ای بهتر می‌شود. در واقع، سرخ کردن یک فرآیند ارزان و سریع انتقال همزمان حرارت، جرم و مومنتم[۴] همراه با فعل و انفعالات پیچیده بین ماده غذایی و روغن می‌باشد؛ بدین‌گونه که گرما از روغن به ماده غذایی منتقل شده و منجر به انتقال جرم (تبخیر رطوبت سطحی بافت ماده غذایی و جذب روغن) و در نهایت تغییرات ساختاری می‌گردد (Xu *et al.*, 2020). در فرآیندهای متداول سرخ کردن، روغن‌های سرخ کردنی به طور متوسط در دماهای ۱۹۵ -۱۷۵ °C در حضور ماده غذایی با هوای محیط در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: rfarhoosh@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.75114.1144

۳- Aroma
4- Momentum

تماس مستقیم است. در این حین، واکنش های هیدرولیزی ناشی از رطوبت موجود در ماده غذایی و تولید ترکیبات شیمیایی مانند زنجیرهای کوتاه آلدئیدی، مشتقات کتونی و هیدروپراکسیدها که باعث تندی و ایجاد طعم ناخوشایند ماده غذایی و روغن سرخ شده می‌شود و همچنین کاهش ارزش غذایی محصول نهایی را در پی دارد (Bordin *et al.*, 2013). اکسیژن، دما و نور سه عامل مهمی هستند که عمر ماندگاری مواد غذایی را به واسطه تشدید فرآیند اکسایش تحت تاثیر قرار می‌دهند.

اکسایش یکی از اصلی‌ترین عوامل فساد مواد غذایی است که اثرات نامطلوبی بر رنگ، بافت، طعم و ارزش تغذیه‌ای ماده غذایی دارد. سرعت اکسایش روغن‌های سرخ کردنی تابع عوامل مستقیم و غیرمستقیم دما، ابعاد تماس روغن با هوای محیط، میزان فلزات اکسید کننده (آهن و مس)، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها، ضدکف‌های سیلیکونی و کیفیت روغن سرخ کردنی می‌باشد. نتایج تحقیقات حاکی از آن است که تیمار حرارتی می‌تواند پایداری اکسایشی، محتوی فنولی و درجه تخریب‌پذیری روغن‌های خوراکی را به واسطه واکنش‌های هیدرولیز، اکسایش، ایزومری شدن، پلیمری شدن و تولید رادیکال‌های آزاد فعال، هیدروپراکسیدها و ترکیبات ثانویه تحت تاثیر قرار دهد (Kharazi *et al.*, 2014). مقاومت به تندی اکسایشی، شاخص عملکرد و عمر نگهداری فرآورده لیپیدی است. در دهه‌های اخیر، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند ترسیوبوتیل هیدروکینون (TBHQ)[1]، هیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA)[2] و هیدروکسی تولوئن بوتیله (BHT)[3] برای حفظ ارزش مواد غذایی بخصوص روغن‌ها و چربی‌ها در برابر اکسایش مرسوم شده است. هر چند، این ترکیبات حلالیت خوبی در روغن دارند و مدت زمان نگهداری مواد غذایی را نیز افزایش می‌دهند؛ اما گزارش‌هایی مبنی بر سمی بودن و سرطان‌زا بودن آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، استفاده از آنها را محدود کرده است (Farhoosh *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر، تلاش بر شناخت و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با منشا گیاهی افزایش یافته است. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ضمن داشتن ارزش آنتی اکسیدانی مناسب، در کاهش میزان سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و سایر مشکلات مزمن تاثیر بسزایی دارند (Gavahian *et al.*, 2019). آنتی‌اکسیدان‌ها با مکانیسم گیرندگی رادیکال‌های آزاد[4] اثر محافظتی بر چربی‌ها و روغن‌ها دارند؛ بدین گونه که با رادیکال های آزاد وارد واکنش شده و با مهار کردن اثرات آنها، مانع واکنش های جانبی بخش فعال رادیکال‌های آزاد با اسیدهای چرب و یون های فلزی و در نهایت، فرآیندهای اکسایش می‌گردند (Sephery *et al.*, 2022). در واقع، ترکیبات فنولی آنتی‌اکسیدان‌ها به واسطه واکنش پذیری بخش فنول (گروه هیدروکسیل حلقه آروماتیک) رفتار آنتی‌اکسیدانی مانند مهار کردن یون‌های فلزی، پذیرش رادیکال آزاد و شکستن زنجیره اکسایش را از خود بروز می‌دهند (Gad *et al.*, 2010). آنتی‌اکسیدان‌ها دارای ارزش آنتی‌اکسیدانی متفاوتی هستند که با در نظر گرفتن طول دوره القا (IP[5]) و همچنین سرعت تشکیل هیدروپراکسید طی دوره القاء، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. هیدروپراکسیدها (LOOH) از حمله الکتروفیلی رادیکال‌های هیدروپراکسیل (LOO•) به بسترهای مستعد لیپیدی تولید می‌شوند (Alavi Rafiee *et al.*, 2018).

اسید گالیک (۳،۴،۵- تری هیدروکسی بنزوئیک)[6] (GA) و متیل گالات (متیل ۳،۴،۵- تری هیدروکسی بنزوات)[7] (MG) رایج‌ترین ترکیبات فنولی موجود در گیاهان می‌باشند. اسید گالیک به عنوان یک افزودنی غذایی ایمن در بسیاری از کشورها بدون محدودیت قانونی برای استفاده توسط عموم پذیرفته شده است. طبق تحقیقات گزارش شده، GA دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی در دمای محیط است. هرچند، اطلاعات در مورد اثر اسید گالیک بر تغییرات حرارتی در تیمارهای حرارتی با دماهای بالا در روغن‌های گیاهی بسیار محدود است (Jung *et al.*, 2016). ترکیب فنولی MG باعث کاهش استرس اکسایشی[8] و صدمات وارده به DNA سلولی می‌شود و مانند مشتقات ویتامین E، اکسایش لیپیدی را کاهش داده و از تغییر سطح گلوتاتیون[9] درون سلولی جلوگیری می‌کند. علاوه بر فعالیت آنتی اکسیدانی، خواص بیولوژیکی MG شامل فعالیت‌های ضد اسپاسم، ضد التهابی و ضد میکروبی نیز گزارش شده است (Huang *et al.*, 2021). طبق یک پژوهش (Farhoosh *et al.*, 2018)، GA و MG توانایی چشمگیری در بهبود تعدادی از پارامترهای سینتیک حرارتی در اکسایش چربی‌ها نشان داده است. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی اغلب اثر کمی در به تاخیر انداختن قدرت اکسایش روغن‌ها و چربی‌ها دارد. مطالعات گزارش شده حاکی از آن است که ارزش آنتی اکسیدانی اختلاط دو یا چند آنتی‌اکسیدان به‌مراتب بیشتر از حالتی است که هر یک از آنها به تنهایی مورد استفاده قرار گیرند. استفاده ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌های اولیه و ثانویه ممکن است به هم افزایی[10] بین آنها منجر شود (Crespo *et al.*, 2019 ; Yanishlieva *et al.*,

1- Tert-butylhydroquinone
2- Butylated hydroxyanisole
3- Butylated hydroxytoluene
4- Free radical scavenging

5- Induction period
6- 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic Acid)
7- Methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (Methyl Gallate)
8- Oxidative stress
9- Glutathione (GSH)
10- Synergy

2002). افزایش پایداری اکسایشی روغن‌های سرخ کردنی از موضوعات مهم و قابل ملاحظه پژوهشگران و صنعتگران فعال در حوزه صنعت تغذیه می‌باشد. هدف از اجرای پژوهش حاضر، مطالعه اثر آنتی‌اکسیدان‌های GA، MG و TBHQ به تنهایی و مخلوط آنتی-اکسیدان‌های GA و MG بر پایداری اکسایشی نمونه روغن ترکیبی (۶۵ درصد وزنی آفتابگردان+۳۵ درصد وزنی نخل) طی فرایند سرخ کردن در دمای ۱۸۰ °C بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: آنتی‌اکسیدان‌های اسید گالیک، متیل گالات و TBHQ با درجه خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگما خریداری شد. حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی از شرکت های Merck آلمان و Sigma Aldrich امریکا تهیه گردید. نمونه‌های روغن آفتابگردان و نخل فاقد آنتی‌اکسیدان از کارخانه سه گل–شهرستان نیشابور و سیب‌زمینی (واریته آگریا) از منطقه فریمان–خراسان رضوی تهیه و خریداری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های روغن آفتابگردان و نخل فاقد آنتی‌اکسیدان تا زمان حرارت‌دهی در دمای ۳ °C در یخچال نگهداری شد. به منظور بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌های GA، MG، GA+MG (با درصد وزنی ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰ و ۲۵:۷۵) و TBHQ بر پایداری اکسایشی مخلوط روغن‌های آفتابگردان و نخل (۶۵ درصد آفتابگردان بر ۳۵ درصد نخل) قبل از فرآیند سرخ کردن، محلول همگونی از آنتی‌اکسیدان‌ها در حلال استون تهیه و در درصدهای متفاوت به صورت مجزا به نمونه‌های روغن اضافه گردید. به منظور حذف حلال استون موجود در نمونه‌های روغن بدون تغییر ساختاری، فیزیکی و شیمیایی از گاز بی اثر N_2 بهره گرفته شد (Alavi Rafiee *et al.*, 2018).

فرآیند سرخ کردن: سیب‌زمینی‌ها پس از پوست‌گیری و برش خوردن به قطعات مکعبی شکل به ابعاد cm ۰/۵×۰/۵×۴، تا زمان اجرای فرآیند درون آب (۲۵ °C) قرار گرفتند. عملیات سرخ کردن بعد از شسته شدن و سپس خشک شدن برش‌های سیب زمینی با جریان طبیعی هوا و اعمال فشار مکانیکی با یک عدد پارچه تمیز و خشک، با استفاده از سرخ‌کن (Hamilton DF-535T) مجهز به ترموستات با دامنه دمایی از منفی ۳۱ تا مثبت ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و سبد توری استیل زنگ نزن در دمای ۱۸۰ °C انجام پذیرفت. نمونه‌های روغن فاقد آنتی اکسیدان و نیز حاوی آنتی‌اکسیدان TBHQ به عنوان نمونه های شاهد مورد ارزیابی و قیاس قرار گرفتند. برای هر تیمار حرارتی، ۳۰ g سیب زمینی در نظر گرفته شد. در کل زمان فرآیند، نسبت وزنی سیب زمینی به روغن ثابت بود. خلال‌های سیب زمینی به مدت ۵ الی ۶ دقیقه سرخ شدند. برای جلوگیری از نوسانات دمای روغن، برش‌ها قبل از خشک کردن به مدت ۳ تا ۵ ثانیه در آب در دمای ۱۰۰ °C قرار داده شدند. فرآیند برای هر تیمار طی یک روز و هر روز ۸ ساعت انجام گرفت. قبل از فرآیند، ۴۵ g روغن به عنوان نمونه در ساعت صفر و در انتهای هر یک ساعت، ۴۵ g روغن از سرخ‌کن برداشته شد و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فالکون‌های دربسته در فریزر (۳- °C) نگهداری گردید. شایان ذکر است که هیچ روغن تازه‌ای برای جبران روغن کاهش یافته بر اثر جذب و نمونه‌گیری طی سرخ‌کردن به سرخ‌کن اضافه نشد. همچنین، فرآیند سرخ‌کردن نمونه‌های برشی در چهار تکرار انجام شد.

تعیین ساختار اسیدهای چرب: ترکیب اسید چرب متیل استر (FAME)[1] نمونه‌های روغن به وسیله کروماتوگرافی گاز–مایع (GLC)[2] مطابق روش توصیف شده توسط فرهوش و همکاران (Farhoosh *et al.*, 2009) تعیین و بر اساس درصد نسبی سطوح، گزارش شد. ترکیب FAME از اختلاط ۰/۳ g از نمونه‌های روغن آفتابگردان و نخل به صورت مجزا با ۷ ml حلال هگزان و ۲ ml حلال هیدروکسید پتاسیم متانولی ۲N تهیه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ °C قرار گرفت. لایه شفاف حاصله بالای لوله به ستون کروماتوگراف گاز–مایع مجهز به ستون‌های مویینه BPX-70 شیشه ای سیلیکا (۶۰ متر طول، ۰/۲۲ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت لایه داخلی) و آشکارساز یونی شعله‌ای و گاز حامل هلیوم (۰/۷ میلی لیتر بر دقیقه) تزریق و درصدهای اسید چرب رصد شد. دمای آون، بخش تزریق و آشکارساز به ترتیب در دماهای ۱۴۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه بر دقیقه، ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود.

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی: محتوی کل ترکیبات فنولی قبل از تیمار حرارتی به روش طیف سنجی با معرف فولین–سیوکالتو[3] مورد بررسی قرار گرفت (Meda *et al.*, 2005). بدین گونه که محتوی کل این ترکیبات با آنالیز محلول استاندارد GA در غلظت‌های مختلف (mg.mL-1 ۰/۷–۰/۴) در حلال متانول مورد مقایسه قرار گرفت. محلول ۵۰ mL از ترکیب ۱ mL محلول استاندارد، ۲/۵ mL معرف فولین سیو–کالچو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) mL و ۵ کربنات سدیم (۷/۵ درصد وزنی حجمی) با آب مقطر به حجم رسانده و تهیه شد. بعد از زمان ماندگاری محلول به مدت ۲۴ ساعت درون ظروف تیره و گسترش فاز آبی، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV/Vis. (Unico S2150, America) در طول

1- Fatty acid methyl ester
2- Gas-liquid chromatography
3- Folin-Ciocalteu

موج ۷۶۵ nm اندازه گیری و منحنی کالیبراسیون غلظت ترکیبات پلی فنولی در برابر میزان جذب رسم شد. شیب منحنی استاندارد برابر با ۰/۱۰۱۷ با ضریب همبستگی ۰/۹۹ بدست آمد. برای تعیین میزان فنول نمونه روغن، محلولی از ۲/۵ g گرم روغن و ۲/۵ mL هگزان نرمال در ۲/۵ mL محلول متانول: آب (۸۰:۲۰) تهیه شد و بعد از عمل ورتکس[1] به مدت ۴۰ ثانیه، عمل سانتریفوژ کردن نمونه به مدت ۵ دقیقه (۵۰۰۰rpm) صورت پذیرفت. پس از جداسازی فازهای آبی و روغنی، فازهای آبی در هر دور سانتریفوژ کردن نگهداری شده و فاز روغنی با ۲/۵ mL محلول متانول: آب (۸۰:۲۰) رقیق شده و عمل سانتریفوژ دوباره به مدت ۵ دقیقه انجام شد. این عمل جداسازی و سانتریفوژ ۳ بار تکرار شد. بعد از مخلوط کردن تمامی فازهای آبی (هیدرومتانولیک) نگهداری شده، به میزان ۲/۵ mL معرف فولین سیو–کالچو و ۵ mL کربنات سدیم به فاز آبی اضافه و با آب مقطر به حجم رسانده شد. میزان جذب پس از زمان ماندگاری محلول به مدت ۲۴ ساعت در ظروف تیره در طول موج ۷۶۵ nm اندازه‌گیری گردید. در این روش، معرف در حضور ترکیبات فنولی در محلول قلیایی احیا و محلولی به رنگ آبی تولید می‌کند (Mehdi Nia Lichani *et al.*, 2018). منحنی استاندارد GA در متانول در دامنه (0/7 mg.mL-1–۰/۴) ترسیم شد و رابطه (۱) با ضریب تبیین ۰/۹۹ بدست آمد (Kharazi *et al.*, 2014).

$$A_{765} = 0.1017X + 0.2639 \quad (۱)$$

در اینجا، پارامتر $A_{765\ nm}$ میزان جذب و X میزان ترکیبات فنولیک نمونه روغن (mg.mL-1) است. محتوی کل ترکیبات فنولی (TP) ($\mu g.g^{-1}$) نمونه روغن طبق رابطه (۲) محاسبه گردید.

$$TP = \frac{X}{W} \quad (۲)$$

در اینجا، X مقدار ترکیبات فنولی نمونه و W وزن نمونه روغن می‌باشد.

اندازه‌گیری ترکیبات توکوفرولی: محتوی کل ترکیبات توکوفرولی بر مبنای آلفا توکوفرول طبق روش فرهوش و همکاران (Farhoosh *et al.*, 2009) مورد سنجش قرار گرفت. در این آزمون، محتوی کل این ترکیبات با آنالیز محلول استاندارد آلفا توکوفرول در غلظت‌های مختلف (0/0–240 mg.mL-1) در حلال تولوئن مورد مقایسه قرار گرفت. روش کار بدین صورت است که ۱ mL از محلول‌های تهیه شده در بالن ژوژه ۱۰ mL میلی‌لیتری با ۵ mL حلال تولوئن مخلوط گردید؛ سپس با اضافه کردن ۳/۵ mL محلول ۲،۲ بی پیریدین[2] (۰/۰۷ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) و ۰/۵ mL کلرید آهن III شش آبه (۰/۲ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) با اتانول آبی ۹۵ درصد به حجم رسانده شد. میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر .UV/Vis (Unico S2150, America) در طول موج ۵۲۰ nm اندازه‌گیری و منحنی کالیبراسیون غلظت ترکیبات توکوفرولی بر حسب میزان جذب رسم شد. شیب منحنی استاندارد در این آزمایش ۰/۰۰۰۱ با ضریب همبستگی ۰/۹۹ بدست آمد. برای تعیین محتوی کل ترکیبات توکوفرولی نمونه روغن، مقادیر ۲۱۰–۱۹۰ g گرم نمونه روغن در داخل بالن ژوژه ۱۰ mL توزین شد. سپس، با اضافه کردن ۵ mL حلال تولوئن و ۳/۵ mL محلول ۲،۲ بی‌پیریدین (۰/۰۷ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) و ۰/۵ mL کلرید آهن III شش آبه (۰/۲ درصد وزنی حجمی در اتانول آبی ۹۵ درصد) با اتانول آبی ۹۵ درصد به حجم رسانده شد و در نهایت، میزان جذب در طول موج ۵۲۰ nm ثبت گردید. میزان محتوی ترکیبات توکوفرولی نمونه روغن ($\mu g.g^{-1}$) طبق رابطه (۳) محاسبه گردید (Mehdi Nia Lichani *et al.*, 2018).

$$TT = \frac{A_{520} - A_{Blank,520}}{M \times W} \quad (۳)$$

در اینجا، A_{520} و $A_{Blank,520}$ به ترتیب میزان جذب نمونه و محلول شاهد، M شیب منحنی استاندارد میزان جذب بر حسب غلظت آلفا توکوفرول و W میزان نمونه روغن می‌باشد.

اندازه‌گیری اسیدیته نمونه: اندازه‌گیری میزان پیشرفت فساد هیدرولیزی نمونه روغن با پارامتر اسیدیته بر حسب میزان اسیدهای چرب آزاد در ۱۰۰ g نمونه روغن تعریف می‌شود. در این روش، میزان ۴ g نمونه روغن در یک ارلن توزین شد و به منظور کاهش ویسکوزیته و افزایش قطبیت روغن، با ۱۰ mL حلال ترکیبی با نسبت برابر اتانول و دی اتیل اتر مخلوط شد. عمل تیتراسیون مخلوط حاصله در حضور معرف فنل‌فتالئین با محلول ۰/۱ N هیدراکسید پتاسیم تا ظهور رنگ صورتی با زمان پایداری ۱۵ ثانیه صورت پذیرفت. میزان اسیدیته (گرم درصد) نمونه روغن طبق رابطه (۴) محاسبه گردید.

$$\%FFA(\text{as oleic acid})=1.99\left(\frac{V\times N\times 28.2}{W}\right) \quad (۴)$$

در اینجا، پارامترهای V و N به ترتیب حجم و نرمالیته سود مصرفی و W وزن نمونه روغن می‌باشد.

تعیین عدد دی‌ان مزدوج (CDV)[3]: به منظور اندازه‌گیری ترکیبات دی‌ان مزدوج طی اکسیداسیون، میزان جذب نمونه شاهد (حلال) و نمونه‌های رقیق شده روغن به نسبت **g** ۱ به ۶۰۰ mL

1- Vortex
2- 2,2́ Bipyridine

3- Conjugated diene value

حلال هگزان در طول موج ۲۳۴ nm ثبت گردید. میزان ترکیبات دی‌ان مزدوج (mmol.L-1) از رابطه (۵) محاسبه شد (Farahmandfar *et al.*, 2018).

$$CDV = \frac{A_{234} \times 600 \times 1000}{K_{CDV}} \quad (5)$$

در اینجا، پارامترهای A_{234} اختلاف میزان جذب نمونه و شاهد در طول موج ۲۳۴ nm، ۶۰۰ رقت نمونه روغن در حلال هگزان و K_{CDV} ضریب ثابت برابر با ۲۹۰۰۰ $mol.L^{-1}$ می‌باشد.

تعیین عدد کربنیل (CV)[1]: به منظور اندازه‌گیری CV که معیاری برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات کربونیلی که اصلی‌ترین ترکیبات ثانویه حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدهای روغن و عامل فساد و تغییرات کیفیت روغن می‌باشد از روش توصیف شده توسط فرهوش و موسوی (Farhoosh and Moosavi 2008) بهره گرفته شد. در ابتدا، به منظور خالص‌سازی حلال از ترکیبات کربونیلی، به ۱۰۰۰ g حلال ۲-پروپانول به میزان ۰/۶ g بوروهیدرید سدیم ($NaBH_4$) اضافه گردید و عملیات رفلاکس به مدت ۱ ساعت صورت گرفت. در ادامه، ۲۰۰-۲۰mg نمونه روغن در بالن ژوژه ۱۰ mL توزین نموده و بعد از به حجم رساندن با حلال رفلاکس شده، ۱ mL از محلول را در یک لوله آزمایش منتقل کرده و ۱ mL معرف ۲و ۴- دی نیترو فنیل هیدرازین (DNPH)[2] که از انحلال ۵۰ mg DNPH در ۱۰۰ mL حلال رفلاکس شده حاوی ۳/۵ mL اسید کلریدریک غلیظ تهیه شده است به لوله آزمایش اضافه گردید و پس از دربندی در دمای ۴۰ °C به مدت ۲۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. در ادامه، بعد از شوک دمایی در حمام آب و یخ به مدت ۱۰ دقیقه، ۸ mL محلول هیدروکسید پتاسیم ۲٪ به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت، عمل سانتریفوژ کردن محلول ورتکس شده به مدت ۵ دقیقه (۴۶۰۰ rpm) در دمای ۲۵ °C صورت پذیرفت. پس از جداسازی فازی، میزان جذب لایه بالایی در طول موج ۴۲۰ nm در برابر نمونه شاهد که تمام مواد شیمیایی مورد نظر به جز استاندارد و نمونه مورد نظر را دارا بود قرائت و رسم گردید. منحنی کالیبراسیون آلدئید ۲ و ۴ دکا دی انال نیز در محدوده غلظتی ۵۰۰-۵۰ µM.g-1 نیز ترسیم شد. شیب منحنی استاندارد جذب در برابر غلظت آلدئید استاندارد برابر با ۰/۰۰۱۶ حاصل شد. بزرگی عدد کربونیل (µmol.g-1) از رابطه (۶) محاسبه گردید.

$$CV = \frac{A_{420} - 0.306752}{100 \times M \times W} \quad (6)$$

در اینجا، پارامتر A_{420} میزان جذب نمونه، W (g) وزن نمونه و M شیب منحنی استاندارد می‌باشد.

آنالیزهای آماری

در این پژوهش به منظور بررسی تاثیر تیمار حرارتی بر پایداری اکسایشی روغن طی فرآیند سرخ کردن از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. جهت بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌های حاصله، قیاس بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد ($p<0.05$) به کمک نرم افزار spss مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در نهایت، نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم گردید.

نتایج و بحث

بررسی خواص شیمیایی نمونه‌های روغن

ساختار اسید چربی نمونه‌های روغن: جدول ۱ ترکیب و میانگین درصد اسیدهای چرب روغن‌های مورد آزمون را نشان می‌دهد. عمده اسیدهای چرب موجود در روغن آفتابگردان (SO) مورد آزمون مربوط به اسیدهای چرب چندغیراشباع[3] (PUFA) لینولئیک (C18:2c) و تک غیراشباع[4] (MUFA) اولئیک (C18:1c) می‌باشد که با یافته‌های دیگر محققان (Farahmandfar *et al.*, 2018 ; Farhoosh *et al.*, 2018) تطابق داشت. محتوی اسید لینولئیک نمونه روغن آفتابگردان پژوهش حاضر به میزان ۶۱/۵۳ درصد حاصل شد که این میزان در استاندارد کدکس (Codex-Stan210-1999) (https://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm.) در بازه ۷۴-۴۸ درصد گزارش شده است. کمترین درصد اسید چرب موجود در نمونه روغن آفتابگردان مورد آزمون مربوط به C14:0، C16:1، C17:0، C17:1، C20:2 و C22:1 می‌باشد که مقادیری کمتر از ۰/۱ درصد حاصل گردید. همچنین، ترکیب و درصد اسید چرب روغن نخل (PO) مورد آزمون (جدول ۱) حاکی از آن است که این روغن با ۴۱/۹ درصد اسید چرب تک غیراشباع اولئیک (C18:1c) و ۳۸/۹۱ درصد اسید اشباع[5] (SFA) پالمیتیک (C16:0)، در بین روغن‌های دارای اشباعیت و در نهایت پایداری بالا می‌باشد. میزان این اسیدهای چرب طبق استاندارد کدکس (Codex-Stan210-1999) به ترتیب در بازه ۴۳/۵-۳۹/۸ درصد و در بازه ۴۳/۵-۳۸ درصد تعیین شده است. روغن‌های خوراکی دارای ساختارهای اسید چرب و درجه غیراشباعیت متفاوتی می‌باشند. در نتیجه این اختلاف‌های ساختاری، بازه وسیعی از پایداری اکسایشی و ویژگی‌های متفاوت فیزیکوشیمیایی حاصل

1- Carbonyl value
2- 2,4-Dinitrophenylhydrazine

3- Polyunsaturated fatty acids (PUFA)
4- Monounsaturated fatty acids (MUFA)
5- Saturated fatty acids (SFA)

می‌گردد. روغن‌های گیاهی برخلاف روغن‌های حیوانی، از درجه اشباعیت کمتری برخوردار هستند که باعث تشدید حساسیت پذیری نسبت به واکنش‌های اکسایشی می‌شوند. هر چند، اثر سلامتی بخش اسیدهای چرب خانواده چندغیراشباع لینولئیک با درصد بالا و اثر سوء اسیدهای چرب اشباع پالمیتیک با درصد پایین، روغن آفتابگردان را دارای جایگاه تغذیه‌ای ارزشمندی بین روغن‌های گیاهی قرار داده است. اما، درصد بالای اسیدهای چرب غیراشباع منجر به کاهش پایداری این نوع روغن در برابر اکسایش شده است. یکی از راهکارهای افزایش پایداری اکسایشی روغن‌ها، اختلاط با روغن‌های حاوی مقادیر بالای اسیدهای چرب اشباع مانند روغن نخل می‌باشد. روغن نخل یک روغن سرخ‌کردنی بسیار محبوب است؛ اما ارزش تغذیه‌ای این روغن با محتوای بالای اسیدهای چرب اشباع با چالش روزافزون روبرو است.

جدول ۱- ساختار اسید چرب روغن‌های آفتابگردان (SO) و نخل (PO) پیش از تیمار حرارتی (بر حسب درصد)

Table 1-Fatty acid composition (%) of the in-use sunflower (SO) and palm (PO) oils

	اسید چرب Fatty acid									
	C18:2c	18:1c	C18:0	C17:1	C17:0	C16:1	C16:0	C14:0	C12:0	C18:3c
SO	61.53	25.50	3.83	0.02	0.03	0.09	6.95	0.08	–	0.22
PO	11.82	41.90	4.37	0.02	0.09	0.18	38.91	1.03	0.22	0.22
	اسید چرب Fatty acid									
	C24:0	C22:1	C22:0	C20:2	C20:1	C20:0	C18:3t	C18:2t	C18:1t	
SO	0.25	0.04	0.76	0.03	0.16	0.26	–	0.24	–	
PO	–	–	0.08	–	0.16	0.36	0.05	0.42	0.08	

محتوی ترکیبات فنولی و توکوفرولی: نتایج آنالیز محتوی کل ترکیبات فنولی و توکوفرولی به عنوان شاخص‌های مهارکننده از پیشرفت اکسایش در جدول ۲ نشان داده شده است. ترکیبات فنولی به لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت بیولوژیکی بواسطه مبارزه با عامل بیماری‌های مربوط به تولید رادیکال‌های اکسیژن با غلظت بیش از ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی[1] بدن انسان حائز اهمیت می‌باشند (Morelló *et al*., 2004). طبق یک تحقیق (Wen *et al*., 2020)، مقدار کل ترکیبات توکوفرولی روغن آفتابگردان مورد پژوه $\mu g.g^{-1}$ ۸۹۱ و طبق پژوهشی دیگر (Tavakoli., 2013) میزان کل ترکیبات فنولی روغن آفتابگردان $\mu g.g^{-1}$ ۱۲/۹ گزارش شده است. ارزش آنتی‌اکسیدانی توکوفرول‌ها که اجزای بسیار مهم بخش غیرصابونی روغن‌های خوراکی به حساب می‌آیند نیز جایگاه ویژه‌ای در ارتباط با سلامتی انسان دارد. توکوفرول‌ها بواسطه واکنش‌پذیری بالا با رادیکال‌های آزاد و سوق دادن واکنش‌های اکسایشی به مراحل پایانی، چربی‌ها و روغن‌ها را در برابر اکسایش محافظت می‌نمایند. در واقع، محتوی کل توکوفرل‌ها و ترکیبات فنولی به عنوان شاخص کیفیت، شرایط کاشت، درجه رسیدگی در هنگام برداشت، نحوه نگهداری و شرایط استخراج روغن می‌باشد. مقادیر پایین این شاخص‌ها بیانگر از بین رفتن کسر قابل توجهی از توکوفرل‌ها و پلی فنول‌ها در طی فرآیند نامناسب تولید، تصفیه، بسته بندی و نگهداری روغن می‌باشد (Fahimdanesh *et al*., 2008).

بررسی تغییرات پایداری اکسایشی طی سرخ کردن

تغییرات اسیدیته: تغییرات اسیدیته تیمارها طی ۸ ساعت سرخ کردن در دمای ۱۸۰ °C در شکل ۱ نشان داده شده است. تیمار شاهد و تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اسیدیته بودند. بین درصد اسیدیته تیمارهای GA25+MG75 و GA50+MG50 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همانطور که مشهود است میزان اسیدیته در نمونه حاوی گالیک اسید به تنهایی از ترکیب آن با متیل گالات کمتر است. این رفتار ناشی از انرژی واکنشی پایین و عدم تمایل رادیکال‌های حاصل از آنتی‌اکسیدان (پس از جدا شدن اتم هیدروژن) به شرکت در واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایش لیپیدی اسید گالیک می‌باشد که باعث عملکرد بالای این آنتی‌اکسیدان در محیط اکسایشی می‌باشد. در نتیجه، رادیکال‌های اسید گالیک با انرژی پایین تمایل کمتری برای حمله به اسیدهای چرب غیراشباع از خود بروز داده که در نهایت، اکسایش را گسترش نمی‌دهند. عامل دیگری که در بیان علت عملکرد خوب اسید گالیک در سامانه روغنی نسبت به مشتقات اسیدهای فنلی می‌توان ذکر کرد، قابلیت بالای اسید گالیک در مهار رادیکال‌های سوپراکسید است (Farahmandfar *et al*., 2018).

1- Antioxidant defense capacity

جدول ۲- محتوی کل ترکیبات فنولی (TPC) و توکوفرولی (TTC) موجود در روغن‌های مورد آزمون پیش از تیمار حرارتی.

Table 2- Total phenolic content (TPC) and tocopherols content (TTC) of the oils before the heat treatment*.

	روغن نخل PO		روغن آفتابگردان SO	
	استاندارد کدکس ۲۱۰ CODEX-STAN210-1999	کار حاضر	استاندارد کدکس ۲۱۰ CODEX-STAN210-1999	کار حاضر
ترکیبات فنولی Phenolic compounds (µg.g^{-1})	–	53.12±0.14	–	36.01±1.03
ترکیبات توکوفرولی Tocopherol compounds (µg.g^{-1})	4-193	185±1.01	403-935	490±99

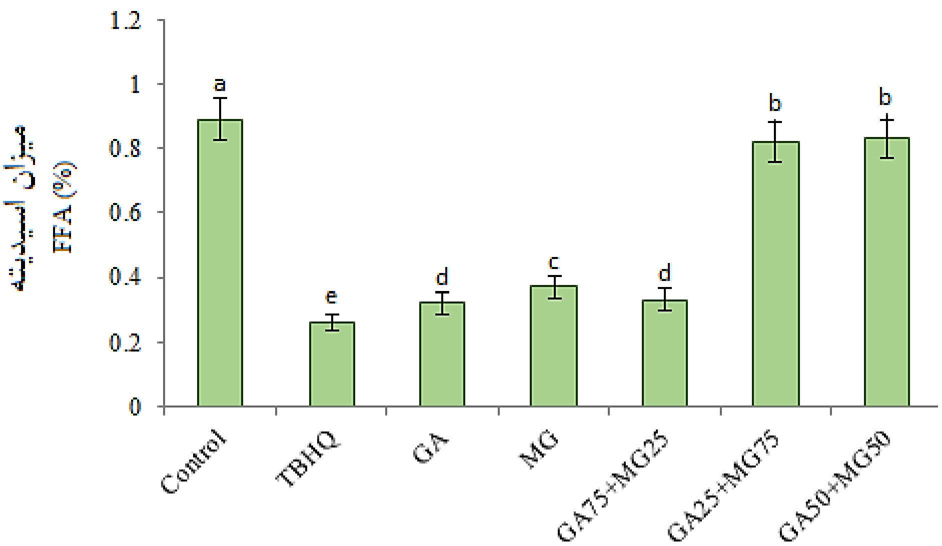
میانگین ۲ تکرار ± انحراف استاندارد.

* Mean ± SD (standard deviation) of duplicate determinations.

درصد اسیدیته روغن‌ها در فرآیندهای سرخ کردن به علت تجزیه تری‌گلسیریدها و آزاد شدن اسیدهای چرب آزاد معمولا با شیب‌های متفاوتی افزایش می‌یابد و مقادیر بالای آن منجر به ایجاد بد طعمی در روغن و محصول سرخ شده می‌شود. افزایش درصد اسیدیته ناشی از واکنش‌های هیدرولیزی تری گلیسسریدها در دماهای بالا می‌باشد. از طرفی، مولکول‌های آب مهم‌ترین عامل تحریک کننده این واکنش‌های زنجیره‌ای محسوب می‌شود. در این پژوهش، به نظر می‌رسد که برش‌های سیب زمینی مورد تیمار حرارتی که به خوبی به طور مکانیکی با دستمال پارچه‌ای آب گیری شده‌اند حاوی میزان ناچیزی از آب باشند که به نوبه خود، واکنش‌های هیدرولیزی را کاهش داده و باعث افزایش میزان اسیدیته با شیب ملایم شده است. همچنین، نمونه روغن مورد تیمار حرارتی از اختلاط روغن آفتابگردان با روغن نخل که دارای اشباعیت و پایداری بالای اکسایشی می‌باشد تهیه شده است که این میزان درصد اسیدهای چرب اشباع موجود در روغن نخل قادر به مهار کردن روند افزایشی واکنش‌های هیدرولیزی و در نتیجه افزایش با شیب تند میزان اسیدیته شده است. از طرفی دیگر، اسیدهای چرب موجود در روغن می‌تواند واکنش‌های هیدرولیزی را کاتالیز کند و از آنجاییکه فراریت اسیدهای چرب در دماهای بالا مانند ۱۸۰ °C یک امر غیر قابل انکار می‌باشد در نتیجه، افزایش میزان اسیدیته با شیب ملایم دور از انتظار نیست (Hajeb *et al*., 2018).

تغییرات عدد دی‌ان مزدوج: تولید ترکیبات دی‌ان مزدوج ناشی از جابجایی پیوندهای دوگانه به هنگام اکسایش PUFA می‌باشد که با درجه اکسایش رابطه مستقیم دارد. در فرآیندهای اکسایشی، لیپیدهای دارای گروه متیلنی در میان دو یا چندین پیوند غیراشباع دستخوش جابجایی موقعیت پیوندهای غیراشباع شده و منجر به تولید ترکیب‌های حاوی دی‌ان مزدوج می‌گردد (Hajeb *et al*., 2018).

نتایج تولید دی ان‌های مزدوج در روغن مورد آزمون در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها طی تیمار حرارتی ۸ ساعته در دمای ۱۸۰ °C در شکل ۲ نشان داده شده است. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن است که تیمار شاهد از حداکثر محتوی CDV برخوردار است و حداقل میزان CDV مربوط به تیمار GA75+MG25 بود که برابر با (mmol.L-1) ۱۲/۷۳ است. محتوی CDV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان به طور قابل توجهی در حضور GA75+MG25 به اندازه ۶۸/۶ درصد کاهش یافت. نتایج حاصله بیانگر نقش موثر این ترکیب آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از تشکیل ترکیبات با آرایش پیوندی جدید در مراحل پیشرفته اکسایش است. از طرفی، بین تیمارهای GA25+MG75، GA50+MG50 و GA اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها در بازه‌های زمانی متفاوت طی تیمار حرارتی بر این مطلب صحه می‌گذارد که در تمامی نقاط زمانی بین عدد دی ان مزدوج به لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری وجود داشت که همواره مقدار این ترکیبات برای ساعت ۸ ام بیشتر بود. به طور کلی، سطوح بیشتر CDV که قابل رصد در طول موج ۲۳۴ nm می‌باشد نشان دهنده پایداری کمتر روغن به اکسایش می‌باشد. طبق شکل ۳، درصد ترکیبات حاوی دی ان‌های مزدوج با پیشرفت اکسایش ابتدا افزایش یافت و سپس روند نسبتا ثابتی به خود گرفت.



شکل ۱- روند تغییرات میزان اسیدیته تیمارهای مورد آزمون طی ۸ ساعت تیمار حرارتی در دمای ۱۸۰ °C

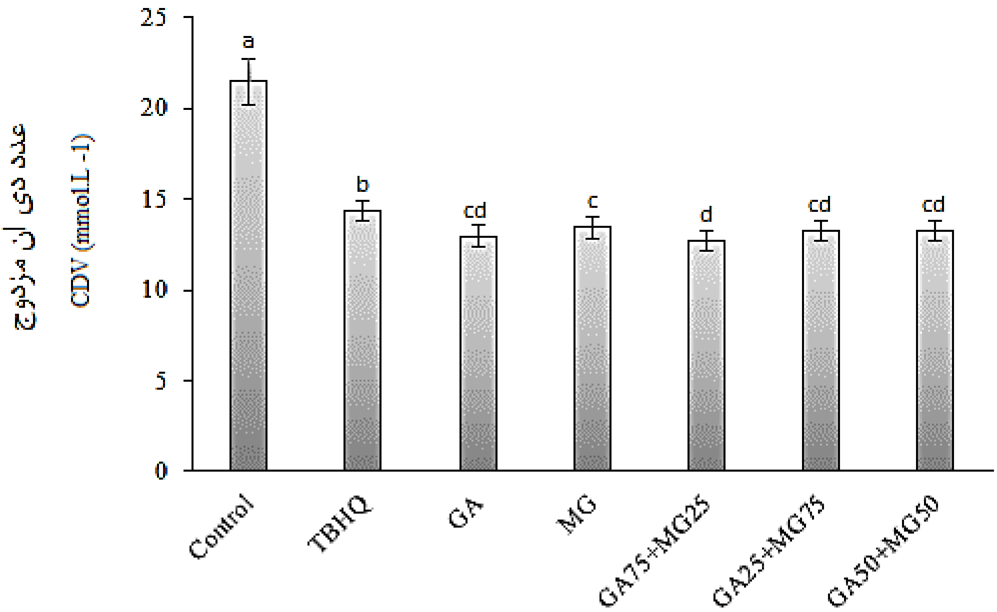
حروف مشترک ستون‌ها بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار طبق آزمون دانکن (p<۰/۰۵) می‌باشد.

Fig. 1- Free fatty acids (FFA) (%) of the in-use oil as affected by antioxidants during frying at 180 °C.
Different letters over bar indicates significant difference between treatments according to Duncan's multiple range test ($p< 0.05$).

رفتار غیروابسته به زمان در مراحل پیشرفته اکسایش، در نتیجه برقراری تعادل میان سرعت تولید دی‌ان‌های مزدوج و سرعت تشکیل محصولات ثانویه اکسایشی و ترکیبات پلیمری بواسطه واکنش دیلز–آلدر[1] بین دی‌ان‌های مزدوج می‌باشد (Xu *et al*., 2022)؛ این رفتار با گزارش‌های همدانی و خداپرست (Hamedani & Khodaparas., 2014) و فرهوش و همکاران (Farhoosh *et al*., 2010) مغایرات دارد. زیرا آنها با بررسی پایداری حرارتی روغن گزارش داده‌اند که عدد دی‌ان مزدوج نمونه‌های روغن طی تیمار حرارتی افزایش یافته و این روند افزایشی طی ۴ ساعت دوم فرآیند حرارتی با شیب تندتری دنبال شده است. آنها ادعا کردند با افزایش زمان حرارت دهی، مقدار هیدروپروکسیدهای دی‌ان مزدوج به مقدار بیشتری افزایش یافته است. شایان ذکر است رابطه مستقیم بین محتوی دی ان مزدوج و درصد حضور MUFA، PUFA و SFA وجود دارد. روغن مورد آزمون از ترکیب روغن آفتابگردان با ۶۱/۵۳ درصد اسید لینولنیک و روغن نخل با ۳۸/۹۱ درصد اسید اشباع پالمیتیک می‌باشد. فرآیندهای تشکیل دی‌ان‌های مزدوج طی تیمار حرارتی را به محتوای اسید لینولنیک موجود در روغن نسبت می‌دهند اما، حضور اسیدهای اشباع پالمیتیک با اشباعیت و در نهایت پایداری بالا می‌تواند اثر اسیدهای چرب غیر اشباعی را تا حدودی خنثی کند. به همین دلیل، در این پژوهش پایداری نسبی تیمارها به اندازه‌ای بود که طی ۸ ساعت فرآیند سرخ کردن، هیچکدام از تیمارها t_{29} که عبارتست از زمان لازم جهت رسیدن به ۲۹ میلی‌مول بر لیتر هیدروپراکسیدهای دی‌ان مزدوج می‌باشد را تجربه نکردند که این مسئله پایداری نسبی نمونه روغن و وقوع تغییرات اکسایشی در زمان بلندتر را نشان می‌دهد (Kharazi *et al*., 2014).

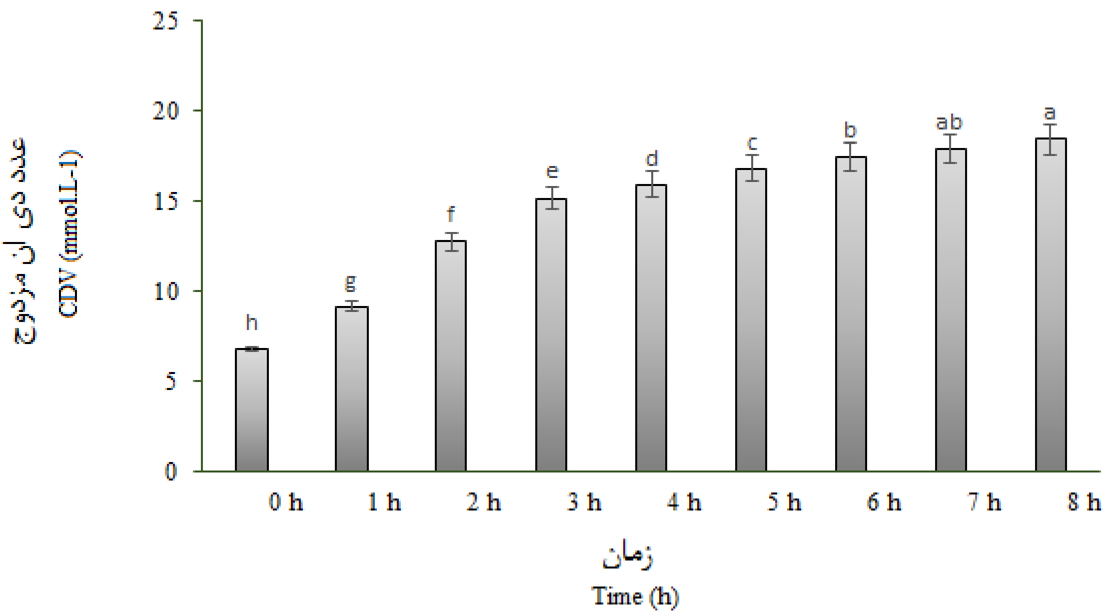
تغییرات عدد کربونیل (CV): ترکیبات کربونیلی به عنوان یکی از اصلی‌ترین ترکیبات ثانویه (آلدئیدها و کتون‌ها) حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدهای چربی، عامل کاهش ارزش تغذیه‌ای، حسی و عمر ماندگاری روغن‌های سرخ کردنی می‌باشند. از CV و CDV به عنوان شاخص‌های استاندارد برای تغییرات اکسایشی در چربی‌ها و روغن‌ها یاد می‌شود زیرا، عدد پراکسید شاخص مناسبی برای بررسی کیفیت روغن در دماهای بالا نمی‌باشد و به علت پایداری بالای ترکیبات کربونیلی، پارامتر CV بهترین مرجع در بررسی تغییرات فساد و کیفیت روغن محسوب می‌شود. روند تغییرات C تیمارهای مورد آزمون طی فرآیند حرارتی ۸ ساعته در دمای ۱۸۰ °C در شکل ۴ نشان داده شده است. مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن است که حداکثر و حداقل میزان CV به ترتیب در نمونه شاهد و نمونه روغن حاوی آنتی‌اکسیدان TBHQ بود.

1- Diels–Alder reaction



شکل ۲- روند تشکیل ترکیب‌های حاوی دی‌ان های مزدوج در تیمارهای مورد آزمون طی ۸ ساعت تیمار حرارتی در دمای °C ۱۸۰. حروف مشترک ستون‌ها بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار طبق آزمون دانکن (p<۰/۰۵) می‌باشد.

Fig. 2- Conjugated diene value (CDV) of the in-use oil as affected by antioxidants during frying at 180 °C. Different letters over bar indicates significant difference between treatments according to Duncan's multiple range test (p< 0.05).

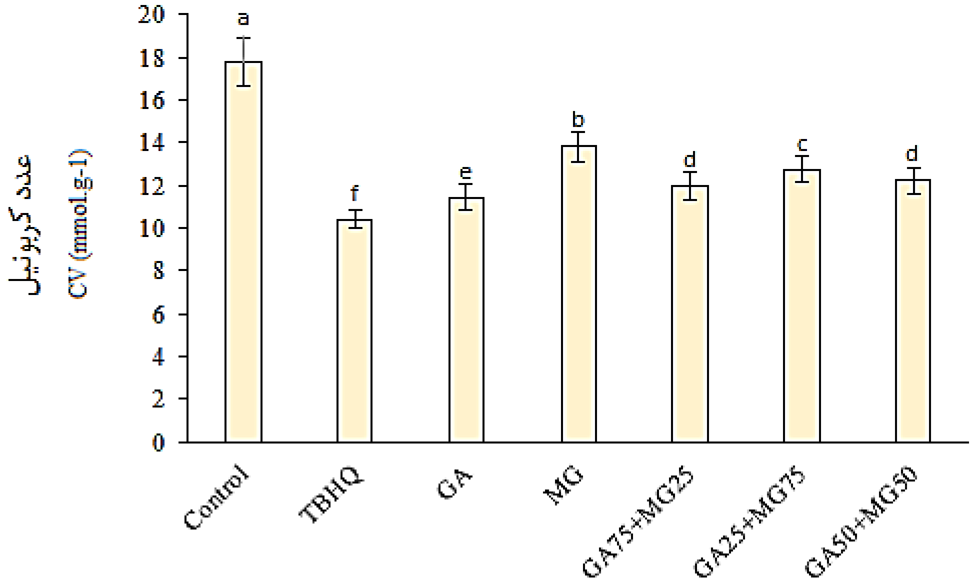


شکل ۳- روند تشکیل ترکیب‌های حاوی دی‌ان‌های مزدوج در روغن مورد آزمون طی ۸ ساعت تیمار حرارتی در دمای °C ۱۸۰

حروف مشترک ستون‌ها بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار طبق آزمون دانکن (p<۰/۰۵) می‌باشد.

Fig. 3- Conjugated diene value (CDV) of the in-use oil as affected during 8-hour frying at 180 °C

Different letters over bar indicates significant difference between treatments according to Duncan's multiple range test (p< 0.05).

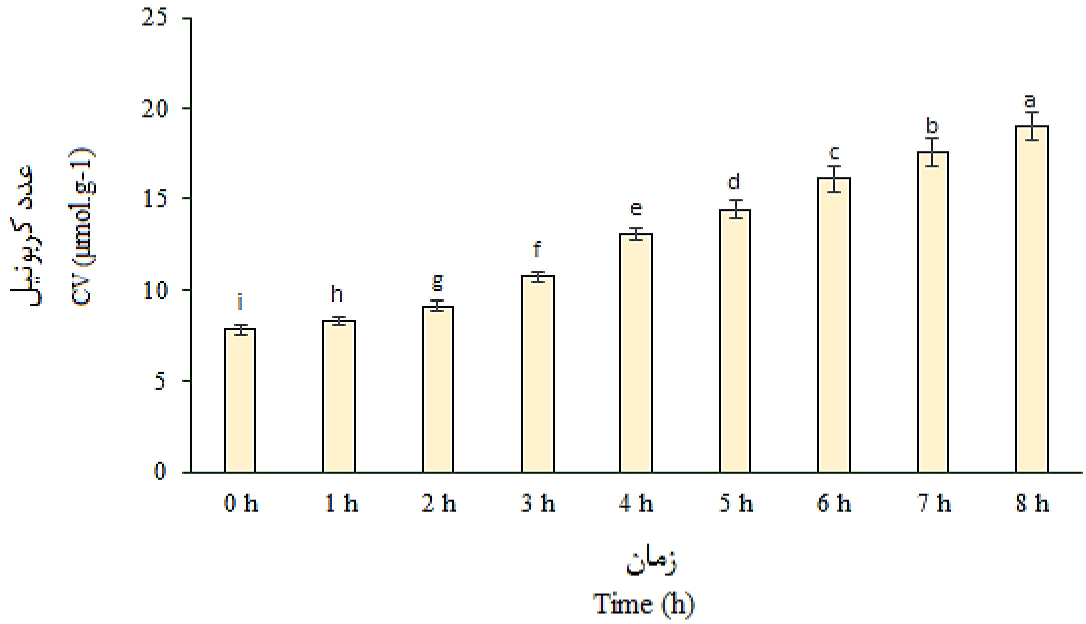


شکل ٤- اثر آنتی‌اکسیدان بر روند تشکیل ترکیبات کربونیلی در روغن مورد آزمون طی ۸ ساعت تیمار حرارتی در دمای ۱۸۰ °C

حروف مشترک ستون‌ها بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار طبق آزمون دانکن ($p<۰/۰۵$) می باشد.

Fig. 4- Carbonyl value (CV) of the in-use oil as affected by antioxidants during frying at 180 °C

Different letters over bar indicates significant difference between treatments according to Duncan's multiple range test ($p< 0.05$).



شکل ٥- روند تشکیل ترکیبات کربونیلی در روغن مورد آزمون طی ۸ ساعت تیمار حرارتی در دمای ۱۸۰ °C

حروف مشترک ستون‌ها بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار طبق آزمون دانکن ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

Fig. 5- Carbonyl value (CV) of the in-use oil as affected during 8-hour frying at 180 °C

Different letters over bar indicates significant difference between treatments according to Duncan's multiple range test ($p< 0.05$)

همچنین، بین تیمارهای GA75+MG25 و GA50+MG50 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. شکل ۴ نشان داد سرعت تغییر CV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان به طور قابل توجهی در حضور TBHQ به اندازه ۷۰/۲ درصد کاهش یافت. نتایج حاصله بیانگر نقش موثر این آنتی‌اکسیدان سنتزی در جلوگیری از تشکیل ترکیبات ثانویه در مراحل پیشرفته اکسایش است. این نتایج با مشاهدات کاویانی و همکاران (Kaviani *et al.*, 2013) و (Farhoosh *et al.*, 2010) همسو می‌باشد. علاوه بر این، وجود آنتی‌اکسیدان‌های GA و MG و نسبت های متفاوت GA+MG در نمونه روغن مورد مطالعه نقش قابل توجهی در کاهش سرعت تشکیل ترکیبات کربونیلی در مقایسه با نمونه فاقد آنتی‌اکسیدان نقش بسزایی داشت. روند تغییرات CV شکل ۵ در تمام تیمارهای مورد بررسی طی فرآیند حرارتی افزایشی بود و بین میانگین داده‌ها در ساعات مختلف نیز تفاوت معنی‌دار آماری (p<۰/۰۵) وجود داشت. این نتایج همسو با گزارش‌های لیچانی و همکاران (Mehdi Nia Lichani *et al.*, 2018) و کاویانی و همکاران [Kaviani *et al.*, 2013] بود. آهنگ ثابت افزایش در محتوی CV طی تیمار حرارتی ناشی از تجزیه ترکیبات کربونیلی و تشکیل ترکیبات جدید می‌باشد که در طول موج ۴۲۰ nm قابل اندازه‌گیری نیستند (Kharazi *et al.*, 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد تیمار حرارتی، ارزش غذایی، شاخص‌های کیفی و ساختار شیمیایی روغن مورد آزمون را تحت تاثیر قرار داده و باعث ایجاد افت در کیفیت و پایداری روغن می‌گردد. طبق نتایج به دست آمده از پروفایل اسیدهای چرب، عمده اسیدهای چرب موجود در روغن آفتابگردان مورد آزمون، مربوط به اسیدهای لینولئیک و اولئیک و در روغن نخل مربوط به اسیدهای چرب تک غیراشباع اولئیک و اسید اشباع پالمیتیک می‌باشد. بررسی خواص شیمیایی نمونه‌های روغن حاکی از آن است که ترکیبات فنلی روغن نخل بیشتر از آفتابگردان و بالعکس، ترکیبات توکوفرولی روغن آفتابگردان ($۴۹۰\ \mu g.g^{-1}$) بیشتر از روغن نخل بود. طبق یافته ها، تمامی پارامترهای FFA، CDV و CV در طی فرآیند سرخ‌کردن با گذشت زمان با سرعت‌های متفاوت به طور معناداری افزایش یافتند (p<۰/۰۵). نتایج حاصله از آنالیزها در بررسی تغییرات پایداری اکسایشی طی تیمار حرارتی ۸ ساعته در دمای ۱۸۰ °C نشان داد که پایداری اکسایشی نمونه روغن مورد آزمون در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها افزایش یافت. بدین صورت که تیمار شاهد و تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان اسیدیته بود. همچنین، محتوی CDV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان در حضور GA75+MG25 به اندازه ۶۸/۶ درصد کاهش یافت. علاوه براین، سرعت تغییر CV روغن مورد آزمون بدون آنتی‌اکسیدان در حضور TBHQ به اندازه ۷۰/۲ درصد کاهش یافت. نتایج حاصله بیانگر نقش موثر این آنتی‌اکسیدان سنتزی در جلوگیری از تشکیل ترکیبات ثانویه در مراحل پیشرفته اکسایش است. مشهود است که بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی ترکیبات فرار و حساس به گرما بوده و استفاده از آنها به منظور ارتقای پایداری اکسایشی مواد غذایی به دلیل احتمال سمی بودن و سرطانزا بودن با محدودیت‌هایی مواجه است (Pinho *et al.*, 2000). همچنین، شواهدی مبنی بر جهش‌زا بودن آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ در بدن موجودات زنده نیز گزارش شده است (Williams *et al.*, 1990). در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی پلی‌فنلی مانند MG و GA مورد آزمون در این پژوهش که پراکندگی زیادی نیز در گیاهان دارند عمدتا دارای خواص ضدمیکروبی و ضدالتهابی می باشند که به عنوان آنتی‌اکسیدان فنولی اولیه شناخته شده‌اند. در مقایسه با GA و MG، آنتی‌اکسیدان‌های GA+MG دارای دوره القای طولانی‌تر و پایداری اکسایشی بالاتری می‌باشد (Budilarto *et al.*, 2015). ارتقای پایداری اکسایشی با چنین چیدمان آنتی‌اکسیدان‌ها گزینه مناسبی در بهره‌گیری از مزایای این رسته از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد. طبق نتایج حاصله از پارامترهای مورد سنجش می‌توان چنین استنباط کرد که با افزایش اندک آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در روغن مورد آزمون، می‌توان شاهد پایداری اکسایشی قابل قیاس با رفتار آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ بود. البته شایان ذکر است که افزودن آنتی‌اکسیدان طبیعی به ماده غذایی مانند روغن‌های خوراکی نیز باید بر اساس استانداردهای ملی و بین المللی صورت گیرد.

منابع

1. Alavi Rafiee, S., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2018). Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative environments. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *120*(11), 1800319. https://doi.org/10.1002/ejlt.201800319.
2. Bordin, K., Kunitake, M.T., Aracava, K.K., & Trindade, C.S.F. (2013). Changes in food caused by deep fat frying-a review. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *63*(1), 5-13.

3. Budilarto, E.S., & Kamal-Eldin, A. (2015). The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*(8), 1095-1137. http://doi.org/10.1002/ejlt.201400200.
4. Crespo, Y.A., Sánchez, L.R.B., Quintana, Y.G., Cabrera, A.S.T., Del Sol, A.B., & Mayancha, D.M.G. (2019). Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L. and *Coriandrum sativum* L. using simplex-lattice design. *Heliyon*, 5(6), e01942. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01942.
5. Fahimdanesh, M., Ghavami, M., Hemasi, A.H., & Aberomand, P. (2008). Evaluation of phenolic compounds and tocopherols content in some trade Iranian olive oils by HPLC. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, *5*(3), 53-59. http://fsct.modares.ac.ir/article-7-1871-en.html.
6. Farahmandfar, R., & Asnaashari, M. (2018). Assessment of antioxidant activity and kinetic oxidative parameters of syringic acid and gallic acid in sunflower oil. *Food Science and Technology*, *15*(83), 1-14.
7. Farhoosh, R., Pazhouhanmehr, S., & Poorazrang, H. (2010). Heat stability of the oils from current canola cultivars in Iran. *Journal of Food Science and Technology(Iran)*. http://fsct.modares.ac.ir/article-7-3334-en.html.
8. Farhoosh, R., & Esmaeilzadeh Kenari, R. (2009). Anti-rancidity effects of sesame and rice bran oils on canola oil during deep frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *86*(6), 539-544. https://doi.org/10.1007/s11746-009-1382-7.
9. Farhoosh, R., & Kafrani, M.H.T. (2010). Frying performance of the hull oil unsaponifiable matter of *Pistacia atlantica* subsp. mutica. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*(3), 343-348. https://doi.org/10.1002/ejlt.200900178.
10. Farhoosh, R., & Moosavi, S.M.R. (2008). Carbonyl value in monitoring of the quality of used frying oils. *Analytica Chimica Acta*, *617*(1-2), 18-21. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.049.
11. Farhoosh, R., & Nyström, L. (2018). Antioxidant potency of gallic acid, methyl gallate and their combinations in sunflower oil triacylglycerols at high temperature. *Food Chemistry*, *244*, 29-35. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.025.
12. Gad, A.S., & El-Salam, M.H.A. (2010). The antioxidant properties of skim milk supplemented with rosemary and green tea extracts in response to pasteurisation, homogenisation and the addition of salts. *International Journal of Dairy Technology*, *63*(3), 349-355. http://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00585.x.
13. Gavahian, M., Khaneghah, A.M., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Garcia-Mantrana, I., Collado, M.C., & Barba, F.J. (2019). Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 220-227. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008.
14. Hajeb, B. (2018). *Comparison of thermal resistance of frying oil and canola oil by principal component of chemometrics analysis*. Thesis for receiving «M.Sc» degree On Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Department of Engineering, Islamic Azad University،Science and Research Branch, Tehran, Iran.
15. Hamedani, F., & Haddad Khodaparast, M.H. (2014). Investigating chemical properties and oxidative stability of kernel oil from *Pistacia* Khinjuk growing-wild in Iran. *Iranian Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, *2*(3): 265-278. http://doi.org/10.1007/s11746-016-2817-6.
16. https://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm.
17. Huang, C.Y., Chang, Y.J., Wei, P.L., Hung, C.S., & Wang, W. (2021). Methyl gallate, gallic acid-derived compound, inhibit cell proliferation through increasing ROS production and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PloS One*, *16*(3), e0248521. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248521.
18. Jung, M.Y., & Choi, D.S. (2016). Protective effect of gallic acid on the thermal oxidation of corn and soybean oils during high temperature heating. *Food Science and Biotechnology*, *25*, 1577-1582. http://doi.org/10.1007/s10068-016-0243-z.
19. Kaviani, M., Niazmand, R., & Shahidi Noghabi, M. (2013). Discarding time evaluation of canola oil based on oxidation indexes during potato deep frying. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, *2*(1), 37-50. https://doi.org/10.22101/JRIFST.2013.07.03.213.
20. Kharazi, S.H., Kenari, R.E., & Amiri, Z.R. (2014). Effect of thermal treatment on chemical changes and oxidative stability of Iranian common virgin olive oil of roodbar region: a study on Zard, Mari and Phishomi. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, *9*(4).
21. Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, *91*(3), 571-577. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006.

22. Mehdi Nia Lichani, B., Esmaeilzadeh Kenari, R., & Dinpanah, G. (2018). Extraction of phenolic and tocopherol compounds of Mottaka plant and study of the effect of its extract on the stability of sunflower oil as a synthetic antioxidant substitute. *Journal of Food Technology and Nutrition*, *15*(4): 81-90.
23. Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., & Romero, M.P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, *85*(3), 357-364. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.012
24. Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P., & Ferreira, M. A. (2000). Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pâtés. *Food Chemistry*, *68*(3), 353-357. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00205-8
25. Sepehry, N., Mortazavi, S.A., Sadeghian, A., Mohammadi, M., & Pedram nia, A. (2022). Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of essential oil and black cumin extract extracted by clevenger and ultrasound methods. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 18(121), 57-68. URL:http://fsct.modares.ac.ir/article-7-53459-en.html
26. Tavakoli, K. (2013). *Antioxidant effect of Medlar peel extract on stability of sunflower oil during storage condition and thermal process.* Thesis for receiving «M.Sc» degree On Food Science and Technology, Faculty of Science-Department Agricultura, Islamic Azad University، Damghan Branch, Iran.
27. Wen, Y., Xu, L., Xue, C., Jiang, X., & Wei, Z. (2020). Assessing the impact of oil types and grades on tocopherol and tocotrienol contents in vegetable oils with chemometric methods. *Molecules*, *25*(21), 5076. http://doi.org/10.3390/molecules25215076
28. Williams, G.M., Wang, C.X., & Iatropoulos, M.J. (1990). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. *Food and Chemical Toxicology*, *28*(12), 799-806. http://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90052-o
29. Xu, E., Wang, J., Tang, J., Ruan, S., Ma, S., Qin, Y., & Liu, D. (2022). Heat-induced conversion of multiscale molecular structure of natural food nutrients: A review. *Food Chemistry*, *369*, 130900. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130900
30. Xu, Z., Leong, S.Y., Farid, M., Silcock, P., Bremer, P., & Oey, I. (2020). Understanding the frying process of plant-based foods pretreated with pulsed electric fields using frying models. *Foods*, *9*(7), 949. https://doi.org/10.3390/foods9070949
31. Yanishlieva, N.V., Kamal-Eldin, A., Marinova, E.M., & Toneva, A.G. (2002). Kinetics of antioxidant action of α- and γ- toco- pherols in sunflower and soybean triacylglycerols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*(5), 262-270. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<262::AID-EJLT262>3.0.CO;2-B